

附件 1. 新增附录 禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）

禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体间接免疫荧光检测法

1 抗原检测

1.1 细胞培养 将已长成良好单层的 Vero 细胞用 8%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 $15\sim 20$ 万个细胞/ml, 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml, 置 37°C 、含 5% CO_2 培养箱培养 48 小时。

1.2 样品接种与培养 当细胞板细胞长成良好单层, 弃去 96 孔细胞板的细胞培养液, 将待检样品作适宜稀释后接种到细胞孔, 每个样品接种 4 孔, 每孔 0.1ml。同时, 将禽偏肺病毒（B 亚群）适宜毒株用无血清 DMEM 培养液稀释为 $10\sim 100\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$, 接种 4 孔, 每孔 0.1ml, 另设正常细胞对照 4 孔。接种后每孔补加含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml, 置 37°C 、含 5% CO_2 培养箱培养 96~144 小时。

1.3 荧光染色

1.3.1 固定 弃去 96 孔板的细胞培养液, 每孔加入 0.2ml PBS (pH 值 7.2~7.4, 下同) 轻洗细胞表面 1 次, 尽量弃尽 PBS; 每孔加入 0.2ml 冷甲醇, 置室温固定 15~30 分钟, 弃去甲醇, 室温自然晾干 3~5 分钟。

1.3.2 加抗体 自然晾干后, 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次; 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的禽偏肺病毒（B 亚群）阳性血清, 置 37°C 作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去孔中液体, 每孔加入 0.2ml 含 0.05%吐温-20 的 PBS, 轻微振荡洗涤 1 分钟, 弃去洗液, 如此洗涤 3 次。

1.3.4 加荧光抗体 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的兔抗鸡 IgG, 置 37°C 作用 1 小时。

1.3.5 洗涤 方法同 1.3.3。

1.4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490 nm）观察。禽偏肺病毒（B 亚群）感染的 Vero 细胞呈现绿色荧光; 未被感染的细胞不着色。

1.5 结果判定

1.5.1 当阳性对照孔出现典型的特异性绿色荧光, 阴性对照孔未出现特异性绿色荧光时, 试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中, 只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光, 则判该样品为禽偏肺病毒（B 亚群）阳性。否则, 判为禽偏肺病毒（B 亚群）阴性。

2 抗体检测

2.1 病毒培养 将禽偏肺病毒（B 亚群）适宜毒株用含 4%胎牛血清的 DMEM 稀释为 $100\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$, 接种到已长成良好 Vero 单层的 96 孔细胞板（细胞制备同 1.1）48 孔, 每孔 0.1ml。同时, 设正常细胞对照孔 48 孔, 每孔加入含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml。置 37°C 、含 5% CO_2 培养箱培养 48 小时, 按 1.3.1 固定干燥。

2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、禽偏肺病毒（B 亚群）阴性血清对照和阳性血清对照分别用 PBS 作 1:64 稀释, 分别加入病毒感染孔和细胞对照孔各 4 孔, 0.1ml/孔, 置 37°C 作用 1 小时。

2.2.2 洗涤 方法同 1.3.3。

2.2.3 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG，置 37℃作用 1 小时。

2.2.4 洗涤 方法同 1.3.3。

2.3 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长为 490nm）观察。当待检血清禽偏肺病毒（B 亚群）抗体阳性时，病毒感染细胞孔呈现绿色荧光，而正常细胞孔无绿色荧光；当待检血清禽偏肺病毒（B 亚群）抗体阴性时，病毒感染孔和正常细胞孔均无绿色荧光出现。

2.4 结果判定

2.4.1 当加入阳性血清处理的病毒感染孔均出现典型的特异性绿色荧光，而加入阳性血清处理的正常细胞孔和加入阴性血清的病毒感染孔以及正常细胞孔均不出现特异性绿色荧光时，试验成立。

2.4.2 被检血清接种的 4 个病毒感染孔中，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则判为禽偏肺病毒（B 亚群）抗体阳性。否则，判为禽偏肺病毒（B 亚群）抗体阴性。

起草说明：

1. 制定依据 禽偏肺病毒（aMPV）属于副黏病毒科肺病毒亚科偏肺病毒属，近年来在世界各地发现。1998 年我国首次检测到 aMPV，随后显示国内鸡场普遍感染 aMPV，部分鸡场阳性率高达 100%，国内鸡群主要感染 aMPV（B 亚群）。现行 SPF 鸡国家标准（GB/T 17999-2008）监测的 19 种微生物中尚未涵盖该病毒。为便于开展对禽源动物源性材料（如 SPF 鸡胚、禽源细胞、毒种等）及制品中是否存在 aMPV 以及鸡群中 aMPV 抗体的检测，特制定该检测方法。本附录标准属于首次起草。

2. 关于禽偏肺病毒（B 亚群）抗原免疫荧光检测法 aMPV 可在 Vero 细胞、CEL 细胞中复制，典型的细胞病变包括细胞变圆、聚堆形成合胞体等。验证了采用 aMPV 阳性血清作为一抗、以 FITC 标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗建立了 IFA 方法，参考《外源病毒检验法（公示稿）》进行外源病毒检测，显示可检出 2~5 TCID₅₀/ml 的外源 aMPV（B 亚群）污染，证明了抗原免疫荧光检测法的可行性。

3. 关于禽偏肺病毒（B 亚群）抗体免疫荧光检测法 验证了 10 日龄、14 日龄、1 月龄、3 月龄的 SPF 鸡血清作为 IFA 一抗的适宜稀释倍数，结果显示：不同日龄的 SPF 鸡在 8~32 倍稀释时即可最大限度避免非特异性反应，同等稀释比例下日龄越小的 SPF 鸡血清非特异性反应越小，64 倍稀释时可完全避免非特异性反应。对 ELISA 抗体检测为阴性（S/P 值≤0.20）的 5 份样品、接近但高于临界值的 5 份样品（S/P 值分别为 0.21、0.22、0.22、0.24、0.28）以及 10 份阳性样品（S/P 值为 0.4~2.0）分别稀释 8、16、32、64 倍进行方法验证，结果显示：5 份阴性样品 8~32 倍稀释后可有效抑制非特异性反应，64 倍稀释时可完全抑制非特异性反应且均无特异性荧光；接近但高于临界值的 5 份样品以及 10 份阳性样品 IFA 效价均不低于 1:64，说明样品稀释 64 倍进行检测是适宜的。因此将判定标准确定为：在阳性血清对照、阴性血清对照和正常细胞对照均成立的条件下，被检血清 64 倍稀释后作为一抗进行 IFA 检测，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，即该样品判为禽偏肺病毒（B 亚群）抗体阳性。

4. 2025 年度第 7 次会议审查意见，将名称改为：禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体免疫荧光检测法。